Omaggio dell'A.

LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE ED ISTOLOGIA DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

Diretto dal Prof. CAMILLO GOLGI.

# SULLA GENESI

DELLE

# PIASTRINE NEI VERTEBRATI OVIPARI

*Studi sperimentali di* **A. NEGRI**

STUDENTE DI MEDICINA.

Lanzoni 323

Morin

DAL BOLLETTINO DELLA SOCIETÀ MEDICO-CHIRURGICA DI PAVIA

**Comunicazione fatta nella seduta del 25 Novembre 1898.**

PAVIA

PREMIATA TIPOGRAFIA FRATELLI FUSI

1899.

LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE ED ISTOLOGIA DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

Diretto dal Prof. CAMILLO GOLGI.

# SULLA GENESI

DELLE

# PIASTRINE NEI VERTEBRATI OVIPARI

*Studi sperimentali di* **A. NEGRI**

STUDENTE DI MEDICINA.

DAL BOLLETTINO DELLA SOCIETÀ MEDICO-CHIRURGICA DI PAVIA

**Comunicazione fatta nella seduta del 25 Novembre 1898.**

PAVIA

PREMIATA TIPOGRAFIA FRATELLI FUSI

1899.

LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE ED ISTOLOGIA DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA
Diretto dal Prof. C. GOLGI.

# Sulla genesi delle piastrine nei vertebrati ovipari.

*Studi sperimentali di* **A. NEGRI**
STUDENTE DI MEDICINA.

Il Bizzozero (1) nel 1883 nel richiamare l'attenzione su un terzo elemento che, oltre ai globuli rossi ed ai bianchi, circola nel sangue dei mammiferi, le piastrine, affermava che nel sangue degli animali a globuli rossi nucleati « si possono dimostrare degli elementi analoghi ». Questi elementi però posseggono un nucleo mentre, nei mammiferi, e emazie e piastrine ne sono prive.

Da quel tempo le piastrine sono state oggetto di numerosi ed accurati studi: però, ancora oggi, le opinioni degli autori sono discordi: molti, con il Bizzozero, le ritengono elementi autonomi, altri no, e sulla loro genesi e sul loro significato espongono ipotesi varie.

Se si riescisse a dimostrare che le piastrine sono capaci di riprodursi come tali, che esse derivano esclusivamente da piastrine preesistenti, l'opinione del Bizzozero avrebbe di certo un fortissimo appoggio. A fornire questa dimostrazione, parve fossero pervenuti Mondino e Sala (2) i quali affermano che, nelle piastrine degli animali a globuli rossi nucleati, si possono riscontrare delle forme di cariocinesi.

Un fatto di tanta importanza, sebbene per esso non venga risolta la questione della genesi delle piastrine dei mammiferi, perchè l' analogia tra queste e le piastrine nucleate non è stata finora con certezza dimostrata, non è stato però tenuto

in quel conto che merita, e, anche nei trattati i più recenti, o non se ne parla ovvero lo si accenna senza pronunciare su di esso un giudizio.

Allo scopo di ripetere le osservazioni di Mondino e Sala e colla speranza di potere eventualmente confermare i risultati da loro ottenuti, ho istituito in questo Laboratorio d'Istologia, per consiglio del Prof. Golgi, una serie di ricerche, delle quali intendo esporre succintamente i risultati.

Credo però indispensabile far precedere un breve sunto dei lavori sull'argomento ed alcune note di tecnica.

***

Le prime osservazioni di Mondino e Sala sono state fatte sulle rane, nel periodo di rigenerazione del sangue dopo un abbondante salasso.

Il sangue era esaminato nel siero di individui della stessa specie, coll'aggiunta di una piccola quantità di acido osmico: colorato col violetto metile.

Nel primo giorno dopo il salasso si avrebbe un aumento considerevole di leucociti, alla fine del secondo e, più ancora, nel terzo, ma non sempre, le forme di scissione delle piastrine. Questa scissione si scosta però alquanto dalla cariocinesi tipica: dapprima si ingrandisce il nucleo, per ingrossamento del filo nucleare: il corpo cellulare aumenta di volume: poi i filamenti si dispongono paralleli all'asse maggiore dell'elemento, per portarsi, in uno stadio più avanzato, « dall'una e dall'altra parte verso i poli della cellula ».

Ne risultano, alle estremità, due gomitoli, riuniti alle volte da qualche filamento, quasi con regola costante, diversi tra loro in grandezza. Il protoplasma subisce uno strozzamento e si hanno le due cellule figlie.

I due osservatori confessano però che i particolari del processo non sono sempre molto evidenti, e che spesso bisogna ricorrere ad altri mezzi (quale l'aggiunta di una soluzione

diluita di acido acetico) per vedere un po' nette le figure nucleari.

Sulla struttura del nucleo e sulle modalità della sua divisione, colla medesima tecnica e sugli stessi animali, ritorna più tardi il Mondino (3).

Egli afferma che il nucleo delle piastrine non ha già una struttura reticolare ma risulta costituito da fili cromatici « disposti parallelamente tra di loro e, in modo più preciso, « a misura che si scostano gli uni dagli altri, si può netta- « mente vedere che formano quattro anse le quali sono così « orientate che la convessità di due di esse guarda un polo « dell'elemento, mentre la convessità delle altre due guarda « il polo opposto: le branche di ciascun paio di anse si in- « tromettono tra quelle dell'altro paio ».

Incomiciato il processo di riproduzione le anse si allontanano tra di loro, subiscono una divisione longitudinale e intanto crescono in lunghezza, il nucleo perciò viene ad essere ingrossato ed, in questo periodo, la sostanza cromatica è uniformemente diffusa in tutta la figura nucleare.

Nelle fasi successive « le anse incominciano a diventare « meno numerose agli estremi del nucleo, mentre si accumu- « lano nella regione sua equatoriale, ciò equivale a dire che « dall'uno all'altro estremo del nucleo una porzione delle « anse scorre verso la regione mediana, ma poi a poco a poco « si accumulano di nuovo le anse ai poli del nucleo aggomito- « landovisi mentre si diradano e perdono il cammino flessuoso « nella regione equatoriale come subissero uno stiramento ». Da questo l'A. deduce che « una parte delle anse scorre da « ciascun polo della figura nucleare verso il polo opposto, « succede naturalmente ad un dato momento che le anse mi- « granti in senso inverso si trovano accumulate, sovrapposte « nella regione equatoriale, poi, oltrepassata questa, arrivano « a quella estremità della figura nucleare alla quale rispetti- « vamente sono destinate. Così formansi due gomitoli polari « riuniti dapprima da filamenti cromatici che vanno dall'uno

« all' altro, ma poi a poco a poco anche questi filamenti fini-
« scono per rientrare nei due gomitoli: così restano formati
« i nuclei figli ».

Alcuni anni dopo Acquisto (4) ripete le stesse osservazioni e conferma, pel sangue delle salamandre e dei tritoni, i risultati del Mondino: suggerisce inoltre per la tecnica, un nuovo liquido, che sarebbe un ottimo fissatore degli elementi del sangue, specialmente delle piastrine, e permette la conservazione dei preparati.

Il Boccardi (5) invece afferma di non aver mai potuto riscontrare nel sangue delle rane e dei polli salassati forme di cariocinesi delle piastrine, fuorchè due forme di spirema.

***

Le mie osservazioni sono incominciate sulle rane e sui tritoni e con le stesse modalità di tecnica impiegata dagli altri.

Sottoponeva l' animale ad un copioso salasso e ne esaminava il sangue uno, due, tre, . . . fin sette giorni dopo.

Come fissatore ho dapprima impiegata la miscela siero-metilica di Mondino e Sala, poi, e su larga scala, il liquido dell'Acquisto. Colorava il sangue, fissato con questo mezzo e dopo una accurata lavatura, col verde di metile e lo montava in glicerina, seguendo esattamente i consigli dell' A.

Però debbo confessare che, sebbene abbia ottenuto in grande copia dei preparati con elettive colorazioni nucleari, c' era sempre in essi, per quante prove abbia fatto, qualche cosa di incerto, di poco chiaro, specialmente per quello che riguarda la forma e la struttura del nucleo. Perciò ho apportato al metodo una modificazione, già impiegata dal Boccardi, la quale, lasciandolo sostanzialmente inalterato, offre dei grandi vantaggi.

Il sangue si raccoglie, si fissa e si lava come al solito: dal fondo del piccolo recipiente dove si deposita, se ne raccoglie una goccia con una pipetta, e la si lascia cadere sulla

faccia di un coprioggetti, sul quale si è distesa poca albumina di Mayer. Si cura che la goccia si distribuisca uniformemente su tutta la superficie del vetrino, e che la quantità di liquido non sia eccessiva, per evitare un soverchio accumulo di elementi, e si lascia disseccare. Gli elementi del sangue non si alterano affatto, se la fissazione era buona, ed i vetrini si maneggiano facilmente e si possono sottoporre a tutte le colorazioni, a tutti i trattamenti più adatti per mettere in rilievo il nucleo. Si ottengono dei preparati assai belli e delle immagini nettissime. Oltre che per il sangue, fissato con il liquido dell'Acquisto, mi sono servito di questo metodo per quello fissato con altri mezzi, il liquido di Flemming, quello d'Hermann, il sublimato ecc.

Il sangue delle rane, nel primo giorno che segue al salasso, presenta, come hanno di già fatto notare Mondino e Sala, un aumento enorme nel numero dei leucociti, di tutte le varietà.

Si trovano in maggior numero anche le piastrine, la maggior parte di forma e grandezza normale, alcune ingrossate. Anche queste però hanno sempre la loro forma caratteristica, elittica od ovale; contorni sempre regolari: a colpo d'occhio si possono distinguere dagli altri elementi.

In queste forme ingrossate di piastrine sperava specialmente di rilevare la struttura del nucleo, quale la descrive Mondino.

Già nelle piastrine di rane normali, osservate sia nella soluzione sodo-metilica, sia nella glicerina, dopo fissazione col liquido dell'Acquisto, aveva ottenuto delle immagini abbastanza vicine alla descrizione data. Con questi metodi il nucleo delle piastrine appare come se fosse costituito da tanti filamenti disposti parallelamente all'asse maggiore dell'elemento; un aspetto presso a poco simile presentano i nuclei delle piastrine, fissate col liquido dell'Acquisto, appiccicate sul vetrino e colorate con un colore nucleare qualunque.

Tutto ciò confermava, nelle linee generali, le descrizioni precedenti, ma tali risultati non mi lasciavano completamente

soddisfatto, perchè era già sorto in me il dubbio che i reperti ottenuti con questi metodi non fossero accettabili senza un rigoroso controllo.

Sono allora ricorso ad altri mezzi, ho adoperato i migliori fissatori nucleari che possediamo, il liquido di Flemming, quello d' Hermann, e con questi e con gli opportuni mezzi di colorazione ho ottenuto infatti risultati assai diversi.

Il nucleo delle piastrine, come già aveva notato Flemming (6), ha una struttura reticolare: non come quella dei nuclei dei globuli rossi adulti, ma di aspetto speciale: lo si direbbe un reticolo a grossi fili, povero in sostanza cromatica, nell' insieme rassomigliante in modo singolare al grosso nucleo di certi globuli rossi, con forma a pera od a clava, abbondanti nel sangue delle rane giovani, e che l' Hyemr (7) ritiene elementi in via di sviluppo, e descrive e riproduce come forme di passaggio dagli ematoblasti (piastrine) ai globuli adulti.

Nelle piastrine ingrossate questa struttura è evidentissima e la si può verificare colla massima facilità.

Assodato questo primo punto, che confermava il mio sospetto circa la non assoluta attendibilità dei risultati ottenuti coi metodi di Mondino e di Acquisto, col più grande interesse ho proseguito l' osservazione nei giorni successivi.

Nel secondo giorno dopo il salasso, permane l' aumento nel numero delle piastrine e dei leucociti, ma si incominciano a notare delle forme speciali ora allungate, ora rotondeggianti, a contorni più o meno irregolari.

Nel terzo, e qualche volta alla fine del secondo giorno, compaiono quelle forme che Mondino e Sala ritengono gli ultimi stadi del processo di divisione. Che queste forme corrispondano a quelle da essi vedute non c' è dubbio, anzitutto per l' epoca in cui si presentano e poi per l' aspetto caratteristico che corrisponde esattamente alla descrizione ed ai disegni. Questi elementi studiati coi metodi finora seguiti danno delle immagini nucleari che corrispondono alla descrizione di Mondino, esaminate invece con la più rigorosa tecnica da

me proposta, lasciano vedere delle particolarità che difficilmente si possono rilevare con gli altri metodi.

Per quanta diligenza abbia posto nell' osservazione, e in preparati nei quali le minime particolarità di struttura risultano nel modo più manifesto, non ho mai potuto notare una immagine, che possa con sicurezza interpretarsi come un processo attivo di divisione, una forma, sia pure atipica, di cariocinesi.

La struttura del nucleo rimane sempre invariata, ma si direbbe che esso subisce una segmentazione, per la quale viene ad assumere i più strani aspetti, come si può vedere dalle figure le quali non riproducono che qualcuna delle forme più caratteristiche. Il nucleo ora si è allungato e sembra stirato nella linea equatoriale (fig. 1), ora si hanno due ammassi nucleari distinti ai due poli mentre il corpo cellulare o è ancora immutato (fig. 2, 3, 4) o presenta già uno stozzamento più o meno manifesto (fig. 5, 6, 7, 8, 9). Altre volte ad una estremità si vede un nucleo, all' altra due o più (fig. 10, 11, 12, 13, 14), ovvero se ne hanno diversi disposti a catena per tutta la lunghezza dell' elemento (fig. 15). Tutti sono riuniti da filamenti *che ho potuto sempre osservare,* più o meno sottili, ma sempre visibili, che si colorano coi colori nucleari e che spiccano nettamente sul protoplasma, il quale apparisce come una leggera sfumatura sul fondo del preparato.

Queste particolarità nella soluzione siero-metilica ovvero in glicerina risultano in modo assai indistinto.

Posto in chiaro questo primo punto, che cioè il nucleo delle forme strozzate nel sangue delle rane sottoposte al salasso, non presenta, quando sia fissato e colorato in modo perfetto, nessuna immagine che valga a confermare l' opinione che si tratti di un processo di mitosi, mi sono chiesto se possiamo ritenerci autorizzati ad affermare che queste forme siano veramente piastrine.

Per rispondere a questa domanda ho cercato con la massima diligenza se si hanno stadi di passaggio tra queste forme strozzate e le piastrine normali : per quanto abbia insistito e

moltiplicato le ricerche coi vari metodi, non ho mai potuto raccogliere una serie di elementi, che con sicurezza si possano ritenere piastrine, e ci conducano per gradi dalle piastrine normali alle forme in questione. Ho trovato invece numerosi leucociti che rassomigliano assai alle cellule strozzate descritte; tra questi si possono rintracciare delle forme che ci permettono di costruire tutta una serie che va gradatamente dai globuli bianchi normali rotondeggianti ai globuli allungati e con nucleo strozzato. Siccome questo fatto potrebbe far nascere il dubbio che si tratti esclusivamente di leucociti, son ricorso ai più svariati mezzi per vedere se mi era possibile di stabilire una distinzione. I caratteri differenziali tra piastrine e leucociti, notati dall'Hayem, se sono facilmente riscontrabili negli elementi normali, non valgono più allorchè la forma e la grandezza del nucleo, l'aspetto della cellula è tanto cambiato. Il modo di presentarsi di questi elementi, allorquando il protoplasma non è modificato dai liquidi fissatori, il modo di comportarsi verso le sostanze coloranti non m'han dato migliori risultati, Anche la proprietà caratteristica dei globuli bianchi di potere inglobare corpi estranei, la fagocitosi, non poteva in questo caso essere utilizzata come criterio differenziale, perchè in questi ultimi tempi il Cajal (8) ha dimostrato e per esperimenti di controllo posso pienamente confermare i suoi risultati, che, quando si iniettano nel sangue della rana delle sostanze corpuscolari, si trovano nelle piastrine dei granuli, precisamente come si trovano nel protoplasma dei globuli bianchi.

Nell'esame a fresco del sangue delle rane, nel periodo più opportuno per l'osservazione delle forme in questione, esame al quale mi sono dedicato con insistenza, allo scopo di riscontrare se il movimento ameboide, proprietà caratteristica dei leucociti, poteva valere come criterio differenziale tra questi e le forme supposte piastrine in via di divisione, ho ottenuto risultati se non decisivi, certo non privi di valore. Dirò subito che anche questi reperti valgono piuttosto confermare

che ad escludere il dubbio già espresso che si tratti unicamente leucociti. In tali preparati, sia ad una temperatura normale, sia ad una temperatura di 30°, 35° C., sono molto evidenti i movimenti ameboidi dei leucociti, mentre tali movimenti mancano assolutamente nelle forme comuni di piastrine. D'altra parte si osservano delle forme allungate, strozzate, in tutto simili alle supposte piastrine in divisione (simili in quanto riguarda la forma, perchè i caratteri del nucleo in tali condizioni non si possono osservare) le quali sono dotate di movimenti ameboidi; non si osservano mai forme strozzate immobili. Facendo penetrare tra il vetrino coprioggetti ed il portaoggetti una goccia di un liquido fissatore, questi elementi si fissano immediatamente, e si vede in esse apparire un nucleo coi caratteri che ho sopra descritto e riprodotto nelle figure.

Da questi reperti si sarebbe condotti a concludere, come ho accennato, che tutte queste forme siano leucociti. Però non mi nascondo che a tale conclusione si possono muovere due obbiezioni: in primo luogo alcuno potrebbe trovare qualche difficoltà a spiegarsi la presenza dei granuli nel protoplasma delle piastrine, mentre questo protoplasma è incapace di movimento ameboide; in secondo luogo non si può escludere in modo assoluto che nel sangue, oltre alle forme strozzate capaci di movimento (leucociti) ve ne possano essere altre che questo movimento non lo presentano (eventualmente piastrine in via di scissione). A questa ultima obbiezione io non posso opporre altro che il numero considerevole ed il costante risultato negativo delle mie osservazioni. Quanto alla prima devo fare osservare che non è ancora dimostrato che i granuli che si trovano nelle piastrine siano da queste attivamente inglobati; potrebbe anche darsi che aderissero semplicemente al protoplasma, ipotesi questa che troverebbe fondamento nella ben nota proprietà del protoplasma delle piastrine, di appiccicarsi ai corpi estranei coi quali viene a contatto (Bizzozero).

Ad ogni modo io non credo autorizzato di venire ad una conclusione certa e mi tengo pago di aver richiamato l'attenzione di una possibile fonte d'errore.

Prima di finire però voglio ancora accennare a due fatti. Prima di tutto che gli animali che si prestano a queste osservazioni, sono assai più rari, di quello che è già stato detto: bisogna far passare diecine e diecine di rane prima di incontrarne una che presenti materiale sufficiente di studio: probabilmente i risultati negativi di Sacerdotti (9) dipendono da questa circostanza. I tritoni, che ho sagrificato su larga scala, danno un reperto ancora più scarso. Poi voglio rammentare, che la presenza delle forme di scissione è sempre unita a quella di gran numero di leucociti. Se la leucocitosi è abbondante si può esser certi che si incontreranno abbondanti anche le cellule strozzate: se i globuli bianchi son pochi, e non presentano nessuna variazione nè nella forma, nè nell'aspetto e numero dei nuclei, gli elementi che ho riprodotto nella tavola o non si notano affatto o sono rarissimi. Questa è una regola quasi costante e credo meriti d'esser posta in rilievo.

***

Il Marzagalli (10) in animali (pesci, rane, uccelli) sottoposti all'azione dei sali di ferro, afferma di avere ottenuto « un « quadro perfetto di rigenerazione del sangue che ricorda « perfettamente la rigenerazione consecutiva ai salassi », le piastrine, in particolar modo, mostrano un processo di moltiplicazione affatto simile a quello descritto da Mondino e Sala.

Finora non ho dati riguardo ai pesci ed ai batraci. Invece nel sangue di colombi, ai quali faceva ogni giorno ingerire una pillola di ctg. 10 di citrato di ferro, dopo sei o sette giorni, proprio nel tempo che l'A. dice il migliore, ho trovato delle forme allungate, o a biscotto, ben diverse dai globuli rossi, e che rammentano assai le stesse forme delle rane dopo il salasso. La presenza nel loro protoplasma di numerosi granuli, fortemente rifrangenti la luce, affatto simili a quelli che si trovano nei leucociti di questi animali, mi fa sospettare che qui si abbia appunto a fare con globuli bianchi e questo dubbio è

rafforzato dal fatto che, nei mammiferi, nei quali uno scambio tra leucociti e piastrine è impossibile, per la somministrazione del ferro ho riscontrato le stesse strane forme.

Queste osservazioni però sono ancora incomplete, e le rammento solo in via incidentale, perchè desidero di continuarle e di estenderle in maggior numero di animali.

***

Da quanto ho esposto credo che si possa concludere:
che le forme descritte da Mondino e Sala come piastrine in via di scissione non presentano caratteri che ricordino un processo attivo di divisione (mitosi in senso lato).
che esse si trovano nel sangue in un periodo nel quale si verifica una leucocitosi straordinariamente abbondante.
che una serie di osservazioni tra loro concordanti, condurrebbero a far ritenere, se non con assoluta certezza, almeno con grande probabilità, che tali forme siano leucociti.

Ringrazio sentitamente il Prof. Golgi, che mi ha guidato in queste ricerche e mi è stato largo di consiglio ed aiuto.

## BIBLIOGRAFIA.

(1) Bizzozero. — Di un nuovo elemento morfologico del sangue e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. Milano, Vallardi 1883.

(2) Mondino e Sala. — Sulla produzione delle piastrine nel sangue di vertebrati ovipari. Nota prima. Palermo, Amenta, 1888. La production des plaquettes dans le sang des vertébrés ovipares. Arch. ital. de Biologie t. XII. Fasc. III.

(3) Mondino. — Sulla genesi e sullo sviluppo degli elementi del sangue nei vertebrati. Palermo. Amenta 1888.

(4) Acquisto. — Ricerche sulla tecnica e sulla istogenesi del sangue Palermo, Amenta. 1894.

(5) Boccardi. — Su la cariocinesi negli elementi del sangue. Riforma medica, Anno IV. Gennaio.

(6) W. Flemming. — Beiträge zur Kenntniss der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. Arch. f. Mikr. anat. Bd. XVI-2. H.

(7) Hayem. — Du sang et de ses altérations anatomiques. Paris 1889.

(8) Cajal. — La fagocitosis de las plaquetas. Revista trimestral micrografica. Vol I. Fasc. I 1896.

(9) Sacerdotti. — Intorno alle piastrine del sangue. Arch. per le Scienze med. N. 1 1893.

(10) Marzagalli. — Studio sulle proprietà di alcuni metalli sul sangue. La Terapia Moderna, Anno V. N. 3.

## SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

Elementi che si riscontrano nel sangue della rana nel terzo giorno seguente al salasso.

Tutte le figure furono disegnate col microsc. Koristka Obb $\frac{1}{15}$, Semiapocr. Imm. Om. — Oc. comp. 8. Tubo mm. 160. — Camera lucida Koristka.

A. Negri - *Sulla genesi delle piastrine nei vert. ovip.*

*A. Negri dis.*

*Lit. Jacchimardi e Ferrari - Pavia.*